

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design*. Pengambilan data hanya dilakukan pada saat akhir penelitian setelah sampel diberi perlakuan dengan membandingkan hasil pada kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif dan membandingkan hasil pada kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan. Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan dari penelitian sebelumnya.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung selama 1 bulan dari bulan Oktober sampai November.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi adalah tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi senyawa DMBA sebagai model tumorigenesis jaringan payudara.

Rattus norvegicus galur *Sprague dawley* umumnya digunakan sebagai hewan uji dalam penelitian karena memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan manusia, yakni termasuk ke dalam kelas mamalia dan memiliki persamaan fisiologis. Selain itu, sifat-sifat *Rattus norvegicus* galur *Sprague dawley* telah diketahui dengan jelas, antara lain: mudah dipelihara dalam jumlah besar, cepat berkembang biak, serta cukup agresif dibandingkan dengan galur lainnya (Permana, 2010).

3.3.2 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 20 tikus betina (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* dengan ciri-ciri berwarna putih, berkepala kecil, ekor lebih panjang daripada badan, dan berumur 5-7 minggu dengan berat rata-rata berkisar antara 100-200 gram, yang diinduksi senyawa DMBA. Jumlah sampel pada penelitian ini didapatkan berdasarkan jumlah perlakuan yang dilakukan. Setiap perlakuan akan menggunakan pengulangan dengan rumus Federer (1977) untuk rancangan acak lengkap yaitu:

$$(t)(n-1) \geq 15$$

dengan t = jumlah kelompok dan n= jumlah sampel tiap kelompok perlakuan

$$(t)(n-1) \geq 15$$

$$(4)(n-1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5$$

Maka banyaknya sampel yang diambil pada masing-masing kelompok adalah 5 ekor tikus. Sehingga total tikus betina yang dibutuhkan sebagai sampel adalah 20 ekor.

a. Kriteria Inklusi

- a. Tikus betina galur *Sprague dawley*
- b. Sehat (rambut tidak kusam, rontok atau botak, dan bergerak aktif)
- c. Memiliki berat 100-200 gram
- d. Berusia sekitar 5-7minggu

b. Kriteria Ekslusi

- a. Tikus sakit atau mati sebelum mendapat perlakuan.

c. Kriteria Drop Out

- a. Tikus tampak sakit atau mati saat mendapat perlakuan.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

a. Variabel bebas (*Independent variable*)

Pada penelitian ini yang menjadi variabel bebas adalah dosis ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata L.*).

b. Variabel terikat (*Dependent variable*)

Pada penelitian ini yang menjadi variabel terikat adalah kadar malondialdehid (MDA) pada jaringan payudara tikus betina

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

Untuk memudahkan pelaksanaan penelitian agar penelitian tidak menjadi terlalu luas maka dibuat definisi operasional pada Tabel 1 sebagai berikut:

Tabel 1. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Skala
	Kelompok kontrol negatif (K1): Tikus hanya diberi akuades 1 ml/hari selama 4 minggu	
	Kelompok kontrol positif (K2): Tikus diinduksi DMBA 20 mg/kgBB 2 kali seminggu selama 4 minggu	
Dosis ekstrak etanol daun sirsak	Kelompok Perlakuan 1 (P20): Tikus diinduksi DMBA 20 mg/kgBB 2 kali seminggu selama 4 minggu dan diberi ekstrak etanol daun sirsak dosis 20mg/kgBB/hari selama 4 minggu	Kategorik
	Kelompok Perlakuan 2 (P40): Tikus diinduksi DMBA 20 mg/kgBB 2 kali seminggu selama 4 minggu dan diberi ekstrak etanol daun sirsak dosis 40mg/kgBB/hari selama 4 minggu	
Kadar MDA payudara tikus betina	Pengamatan dilakukan dengan membandingkan kadar malondialdehid antara kelompok perlakuan coba dengan kelompok positif dan kelompok negatif	Numerik

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan berupa gelas ukur 500 ml, tabung Erlenmeyer, *blender*, *rotary evaporator*, kertas saring, kandang, tempat minum dan makan, timbangan digital, sonde lambung berujung *Nasogastric tube* (NGT), alat bedah minor, pisau, timbangan digital, gelas ukur 100 ml, *micropestle*, *sentrifuge* Eppendorf 5417R, tube ukuran 1,5 ml,

waterbath, S-30 spektrometer BOECO, mikropipet, *upright freezer* – 80°C Kaltis, lemari es $\pm 4^{\circ}\text{C}$, dan vortex Biosan.

3.5.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah simplisia daun sirsak 500 mg, tikus betina (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*, etanol 70%, 7,12-dimetilbenz(a)antrasen (DMBA), minyak jagung, akuades, *ketamine-xylazine*, akuades, akuabides, larutan asam trikloroasetat (TCA) 20%, larutan asam tiobarbiturat (TBA) 0,67%, larutan standar tetraetoksipropan (TEP), dan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) 0,1 M dengan pH 7,4.

3.6 Prosedur Penelitian

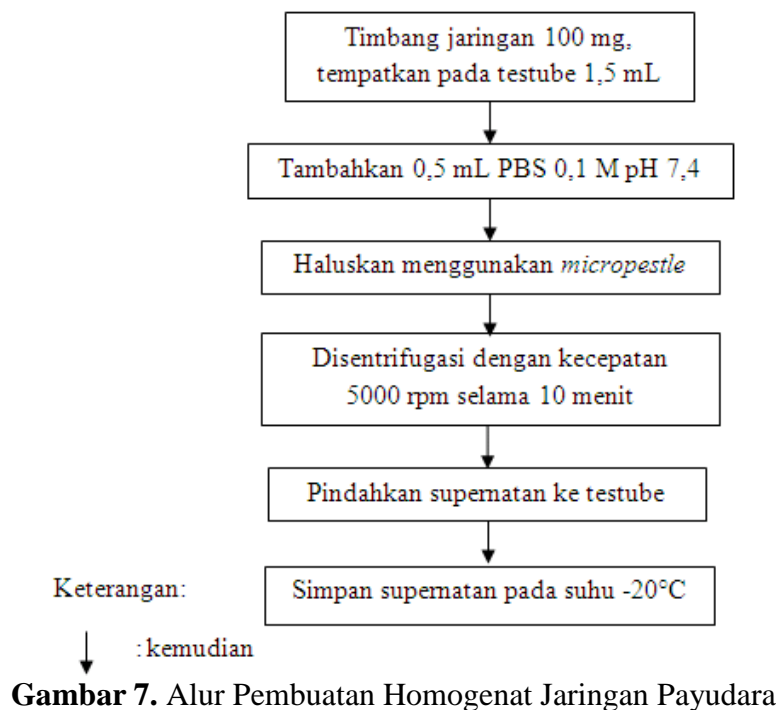
Pada penelitian sebelumnya sudah dilakukan perlakuan terhadap 4 kelompok tikus. K1 sebagai kelompok negatif yang diberikan akuades 1 ml/hari selama 4 minggu; K2 sebagai kelompok positif yang diinduksi DMBA 20 mg/kgBB 2 kali seminggu selama 4 minggu; kelompok P20 yang diinduksi DMBA 20 mg/kgBB 2 kali seminggu dan ekstrak daun sirsak 20 mg/kgBB/hari selama 4 minggu; dan kelompok P40 yang diinduksi DMBA 20mg/kgBB 2 kali seminggu dan ekstrak daun sirsak 40 mg/kgBB/hari selama 4 minggu. Kemudian setelah 4 minggu, tikus diterminasi dengan metode *cervical dislocation*, jaringan payudara tikus diambil dan disimpan di dalam lemari es

pada suhu -4°C selama 1 hari, lalu suhu diturunkan menjadi -80°C dan disimpan pada *freezer* Kaltis -80°C untuk penelitian selanjutnya.

3.6.1 Pengeluaran Jaringan Payudara Tikus dari Suhu -80°C

Jaringan payudara tikus diambil dari *freezer* Kaltis -80°C dan dipindahkan ke dalam lemari es dengan suhu -4°C selama 1 hari.

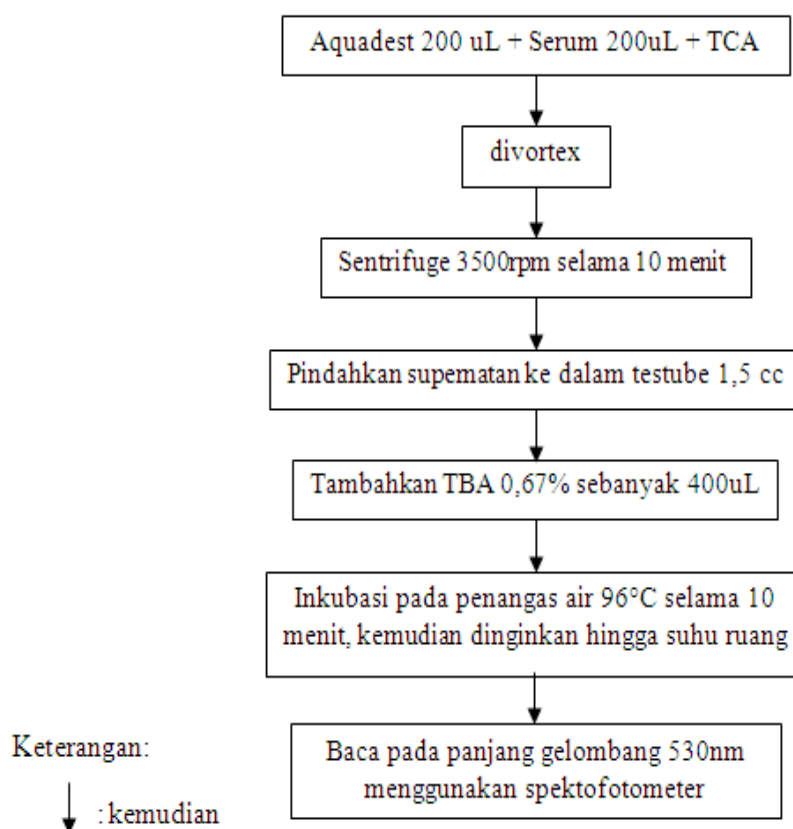
3.6.2 Pembuatan Homogenat Jaringan Payudara



Sampel jaringan payudara yang telah diambil dari tikus percobaan dipotong menjadi ukuran kecil kemudian ditimbang sebanyak 100 mg. Lalu dibuat homogenat dengan menambahkan PBS 0,1 M pH 7,4 pada

sampel dengan perbandingan sampel:PBS = 1:1 secara bertahap sambil terus dihaluskan menggunakan *micropestle*. Setelah itu, homogenat yang telah dibuat disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Kemudian supernatant diambil dan dipindahkan ke tube kosong. Kemudian supernatant disimpan pada suhu -20°C .

3.6.3 Pengukuran Kadar Malondialdehid (MDA)



Gambar 8. Diagram Alir Pengukuran Kadar MDA

Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan metode Wills (1987). Prinsipnya adalah mereaksikan MDA dengan asam tiobarbiturat sehingga terbentuk senyawa berwarna yang memberikan serapan

maksimal pada panjang gelombang 530 nm.

Sebelum melakukan pengukuran serapan pada larutan uji, terlebih dahulu dilakukan pengukuran serapan pada larutan standar *Tetra Etoksi Propan* (TEP). Terhadap masing-masing standar *Tetra Etoksi Propan* (TEP) yang diencerkan dengan akuades 1:80.000 sebanyak 400 μL ditambahkan 200 μL TCA 20% lalu divortex sehingga campuran menjadi homogen. Campuran kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit dan diambil supernatnya. Sebanyak 400 μL TBA 0,67% ditambahkan pada supernatan dan dilanjutkan dengan pemanasan di atas penangas air 96^oC selama 10 menit. Setelah itu larutan disentrifugasi kembali pada 5000 rpm selama 5 menit dan dibaca serapannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 530 nm.

Setelah itu, lakukan pengukuran pada larutan uji, yaitu akuades dipipet sebanyak 200 μL ke dalam tube 1,5 cc, lalu tambahkan supernatan jaringan sebanyak 200 μL , kemudian ditambahkan 200 μL TCA 20%. Kemudian larutan divortex dan disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan dipindahkan ke tube 1,5 cc yang baru, lalu ditambahkan 400 μL TBA 0,67%, kemudian dipanaskan di atas penangas air 96^oC selama 10 menit. Setelah itu, larutan didinginkan selama 5 menit, kemudian serapan dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 530 nm.

3.7 Pengolahan dan Analisis Data

Uji Normalitas Data

Analisis statistik dilakukan dengan bantuan program statistik. Hasil penelitian akan dianalisis apakah memiliki distribusi normal atau tidak secara statistik dengan uji normalitas Shapiro-Wilk karena jumlah sampel kurang dari 50.

Uji Varians

Hasil penelitian akan dianalisis apakah homogen atau tidak secara statistik menggunakan uji Levene.

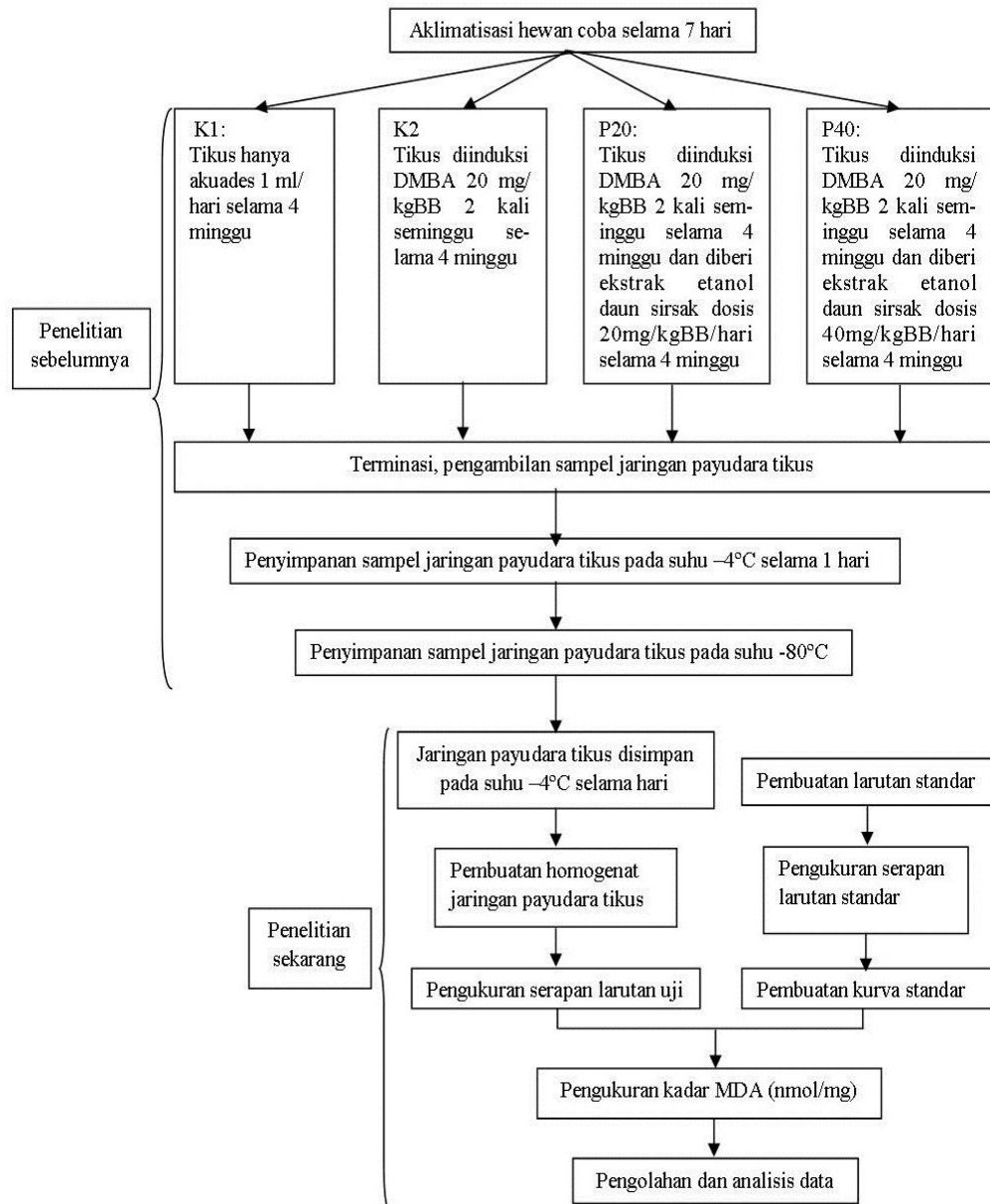
Uji Parametrik

Jika varians data berdistribusi normal dan homogen, dilanjutkan dengan metode uji parametrik *one way* ANOVA. Apabila distribusi data tidak normal dan varians data tidak homogen, akan diuji dengan uji Kruskal-Wallis.

Uji *Post Hoc* LSD

Jika pada uji *one way* ANOVA menghasilkan nilai $p < 0,05$ (hipotesis dianggap bermakna) maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *post-hoc* LSD untuk mengetahui perbedaan antarkelompok yang lebih terinci. Sedangkan alat untuk melakukan analisis *post-hoc* untuk uji Kruskal-Wallis adalah dengan uji Mann-Whitney.

3.8 Diagram Alir



Gambar 9. Diagram Alir Penelitian Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sirsak Terhadap Kadar MDA Jaringan Payudara Tikus Putih Betina yang Diinduksi DMBA

3.9 Etika Penelitian

Penggunaan hewan coba di dalam penelitian perlu dijamin kesejahteraannya, sehingga dalam penelitian kesehatan yang memanfaatkan hewan coba harus diterapkan prinsip 3R dalam kontrol penelitian, yaitu *replacement*, *reduction*, dan *refinement*. Sebelum penelitian, peneliti telah mengajukan *ethical approval* ke Komisi Etika Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.